



Title	単一分子蛍光法によるDNA認識酵素の評価
Author(s)	金城, 政孝
Citation	電子科学研究, 1, 77-78
Issue Date	1993
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24287">https://hdl.handle.net/2115/24287</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	1_P77-78.pdf



# 単一分子蛍光法による DNA 認識酵素の評価

細胞機能素子研究分野 金城 政 孝

Klenow 酵素と Rhodamine-4-dUTP を用いて蛍光標識をした DNA を合成し、その拡散速度を自己相関蛍光測定法を用いて測定した。50 bp から 500 bp の範囲の 2 重鎖 DNA の拡散速度はその鎖長にほぼ比例し、また得られた値は回転楕円体や棒状分子として計算した拡散速度に良く一致した。蛍光標識 DNA (500 bp) を T7 exonuclease を用いて 3' 末端から順次分解してその時の拡散速度の変化から酵素活性を測定した結果  $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  と  $0.03 \text{ s}^{-1}$  の速度常数が得られた。また放出される Rho-dUMP の分子数から標識 DNA 1 分子当たり約 20 分子の Rho-dUTP が取り込まれたことが分かった。

## はじめに

DNA や RNA の検出と分子量測定は生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段であり、現在極めて一般的な検出法はアガロースやポリアクリルアミドを用いたゲル電気泳動法である。本研究はアルゴンレーザーと自己相関蛍光測定法 (Fluorescence correlation Spectroscopy, FCS) を組み合わせた単一分子検出法を DNA のサイズと溶液中の分子数の同時測定に応用したものである。近年の FCS 開発の進展は様々な FCS の特徴を明らかにした [1-3]。1) 測定される並進拡散速度の範囲が広いこと。この事は、アミノ酸や核酸などの低分子基質から、蛋白質、染色体、生体膜や細胞までの複合体まで広い範囲をカバーできることを示唆している。2) 共焦点顕微鏡を用いることにより観察している視野が微小領域 ( $0.24 \times 10^{-15} \text{ l}$ ) となり、必要な試料量は少なくすむ。この特質は試料を調整するのが困難なときや、生物学や遺伝学でしばしば起きるが、希産種や変種などサンプル量自体が制限されているときに重要である。3) データを解析するプログラムやパーソナルコンピューターの発展により、データを集める時間や、データ分析の時間が短くなり応用分野が広がるようになった。

本稿では蛍光標識をした 2 重鎖 DNA の水溶液中の拡散速度の性質、特に拡散速度と鎖長の関係について報告する。また、蛍光標識 DNA を 3' 末端から順次 T7

exonuclease を利用して切断して行き、その時に切り放される蛍光分子を FCS を用いて数えることにより、酵素活性の測定と 2 重鎖 DNA に含まれる蛍光プローブの数を見積った。

## 方 法

種々の長さの 2 重鎖 DNA (50 bp, 217 bp, 343 bp, 500 bp) を PCR を用いて合成し、エタノール沈澱法により回収した。以上のサンプルと 1 重鎖 M13 mp18 DNA (7250 b) を鋳型とし、Rhodamine-4-dUTP 存在下、DNA polymerase として klenow 酵素を用いて蛍光標識 2 重鎖 DNA の合成を行った。合成した蛍光標識 DNA は Sephacryl S-400 カラムクロマトグラフィーにより精製し、溶出液をそのまま FCS の試料とした。

自己相関蛍光測定装置は cw アルゴンレーザー (SP model 165, 514.5 nm, 500  $\mu\text{W}$ )、共焦点蛍光顕微鏡 (Leitz)、アバランチホトダイオード (EG&G, SPCM-100)、コリレーター (ALV, ALV 5000) からなる。試料は顕微鏡の対物レンズの表面に直接乗せた。

測定で得られた相関関数の相関強度の逆数から視野中に存在する平均蛍光分子数が決定され、相関値が 1/2 になる時間で定義される相関時間から平均の並進拡散時間が決まり、拡散速度が推定される。

## 結 果

Fig.1に2重鎖DNAの鎖長に依存する相関時間の変化を示す。鎖長が長くなるにしたがって相関時間も長くなる事が分かる。DNAやタバコモザイクウイルスのような棒状をした物質の溶液中での拡散速度(摩擦係数)についての理論的研究はPerrin, Broersma, Bloomfieldなどがあるが、我々の結果は7250 bp DNA(環状)の拡散時間のデータを除いてそれらの理論値とよく一致した。

次に蛍光標識した500 bpDNAを基質としてT7 exonuclease(T7exo)による分解過程を調べた(Fig.2)。時間と共に相関関数が右から左へシフトし、かつ相関強度は時間と共に小さくなり蛍光分子が増加していることが示されている。これはT7exoがDNAの3'末端からDNAを順次切断するに従って、元々のDNAが短くなることと切り出されたモノマー

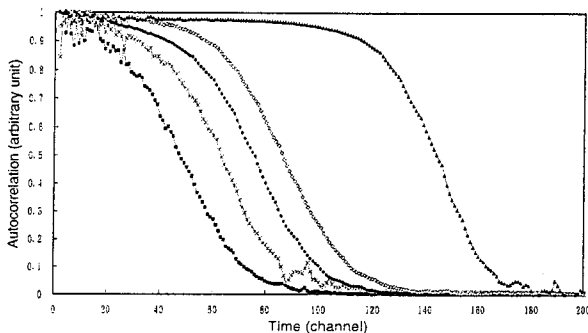


Fig.1 Autocorrelation function of diffusion of DNA molecule. Each DNA was synthesized by using the Klenow enzyme (4U) in the presence of 50mM dUTP and 25mM dTTP. Translational diffusion time for 7250 bp (▲): 10m sec, 500bp (◇): 2.25m sec, 217bp (●): 0.95m sec, 50bp (\*): 0.45m sec and Rho-dUTP (◆): 0.086m sec. Ordinate scale is normalised to unity.

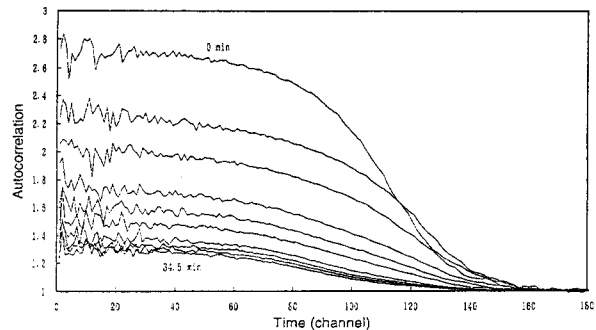


Fig.2 The change of autocorrelation function of 500bp DNA treated by T7 exonuclease. The reaction was carried out with T7 exonuclease (3  $\mu$ M) and 500bp DNA (4nM) in 10 $\mu$ l buffer contained 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1M NaCl, 1mM EDTA and 10mM MgCl<sub>2</sub> at 20°C. The reaction was started by adding the enzyme (1  $\mu$ l) and then measured after 0.5, 1.5, 3.5, 6.5, 9.5, 14.5, 19.5, 29.5 and 34.5min.

の蛍光分子(Rho-dUMP)の増加の双方の要因により説明される。詳しい解析の結果、 $1.5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ と $0.03 \text{s}^{-1}$ 速度常数を得た。また酵素反応に従って蛍光分子は500 bpDNAの4.1 nMから反応終了後には26.7 nMに増加しており、これはDNA鎖一分子当たり約6分子のRho-dUMPを放出したことになる。さらに切れ残りのDNA鎖の長さを拡散速度から350 bpと見積ることができ、その結果20分子のRho-dUTPが500 bp中に含まれていたことになる。

### 【終わりに】

自己相関蛍光測定法によりDNAの鎖長と酵素反応液に含まれる基質濃度の変化を同時に測定できることを示した。この方法は微量、希釈条件下において酵素活性を測定するのに今後有効になると思われる。

### 【参考文献】

- [1] Rigler, R. & Widengren, J. in BioScience (Klinge and Owman eds) 3; 180-183(1990)
- [2] Soper, S.A., Shera, E.B., Martin, J.C., Jett, J.H., Hahn, J.H., Nutter, H.L. & Keller, R.A. Anal Chem 63; 432-437 (1991)
- [3] Rigler, R. & Metz, U. SPIE 1921; 239-248 (1992)